

氏 名	小林 大祐
学 位 の 種 類	博士 (薬学)
学 位 記 番 号	博甲第 716 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 22 日
学位授与の要件	課程博士 (学位規則第 4 条第 1 項)
学位授与の題目	OCTN トランスポーター群の発現プロファイルと生理的機能
論文審査委員 (主査)	加藤 将夫 (自然科学研究科・助教授)
論文審査委員 (副査)	辻 彰 (自然科学研究科・教授), 宮本 謙一 (医学部附属病院・教授), 中西 義信 (医学系研究科・教授), 玉井 郁巳 (東京理科大学・教授)

## 学 位 論 文 要 旨

Although organic cation/carnitine transporters OCTN family members exhibit more than 60 % similarity each other, their tissue distributions and transported substrates are variable. In the present study, in order to clarify the physiological roles of OCTNs, tissue and cellular distributions, localizations and driving forces were examined. OCTN2 was localized at the brush-border membrane of renal proximal tubular epithelial cells and its driving forces for carnitine transport were  $\text{Na}^+$  and membrane potential, showing that OCTN2 mediates renal reabsorption of carnitine. Secondly, I demonstrated that OCTN2 was essential for carnitine distribution from plasma to testis and epididymis from the results by using primary cultured Sertoli cells, epididymal epithelial cells, and functionally OCTN2-deficient mice. Thirdly, OCTN3 was predominantly expressed in spermatozoa and mediated carnitine transport. Fourthly, since OCTN1 transports organic cations by using  $\text{H}^+$  gradient and was localized at the brush-border membrane of renal proximal tubular epithelial cells, it was speculated that OCTN1 is involved in renal excretion of organic cations. Finally, it was demonstrated that an expression of OCTN1 is associated with myeloid cells especially with erythroid-lineage cells at the transition stage from immature erythroid cells to peripheral mature erythrocytes rather than lymphoid cells. In conclusion, it was clarified that OCTN2 and 3 are involved in carnitine transport in kidney and male reproductive tissues for the reabsorption of carnitine and maturation of spermatozoa. It was suggested that OCTN1 plays important roles in kidney or blood cells, while physiological substrate of OCTN1 has not been clarified.

細胞膜トランスポーターは、生体内物質および外因性物質の体内濃度、その分布性を決めるひとつの因子である。様々なトランスポーター分子がクローニングされ、今日まで報告されている現象論的な輸送系の分子の実体が明らかになりつつある。一方で、分子生物学的手法によりその存在が示されたにもかかわらず、本来の基質や生理的な役割が明確ではないトランスポーターも多く存在する。この問題を解決して行く手段としてトランスポ

一ター分子の組織分布性、発現細胞特異性、極性細胞における膜局在性、輸送駆動力、および発現部位の生理環境の特異性などが、その生理的意義を予測する上で有用な情報を与える可能性がある。

本研究では、1997年から2000年に当研究室において分子同定された有機カチオン／カルニチントランスポーター群 OCTN1、OCTN2 および OCTN3 が生体内においてどのような生理的役割を担っているのか明らかにすることを目的に、1. 組織分布、2. 膜局在性、3. 駆動力の3点に特に注目して研究を進めた。まず、OCTN トランスポーター群の生理的役割を、長鎖脂肪酸の $\beta$ 酸化に必須な carnitine を輸送するトランスポーターである点に着目し解明しようと考えた。さらに、carnitine よりもむしろ有機カチオン化合物の輸送活性が高い OCTN1 の役割を、発現の高い腎臓および造血組織に注目し検討した。

### 1. OCTN2 の carnitine 輸送の駆動力と腎臓における局在性

OCTN2 は、腎臓に強く発現しており、その carnitine 輸送特性は腎尿細管刷子縁膜に存在する  $\text{Na}^+$ /carnitine 共輸送担体と類似している。また、OCTN2 活性を遺伝的に欠損した *jvs* マウスでは、carnitine の尿細管再吸収が不全である。そこで私は、OCTN2 の腎臓での生理的役割を明らかにするため、OCTN2 の駆動力と腎臓における局在性を検討した。

細胞膜ベシクルを用いた検討により、 $\text{Na}^+$ 勾配が OCTN2 の carnitine 輸送の駆動力であり、 $\text{Na}^+$ と carnitine を 1:1 で共輸送し、正味一価のカチオンの移動が起きるため、膜電位に感受性の起電的な二次性能動輸送トランスポーターであることが証明された。さらに、OCTN2 が腎臓の刷子縁膜に局在することを示し、当初推定された通り、OCTN2 は腎臓の刷子縁膜に存在する  $\text{Na}^+$ /carnitine 共輸送体の分子実体であり、糸球体ろ過を受けた carnitine の再吸収トランスポーターであると結論付けられた。

### 2. セルトリ細胞における OCTN2 を介した carnitine 輸送

OCTN トランスポーター群は OCTN1、OCTN2 および OCTN3 すべてが、精巣に発現しており、精巣において OCTN トランスポーター群が重要な役割を担っている可能性がある。そこで、血液精巣関門を構成しているセルトリ細胞に着目し、セルトリ細胞における carnitine 輸送活性を測定した。

初代培養セルトリ細胞の basolateral 側膜での carnitine 輸送実験より、OCTN2 様の高親和性の  $\text{Na}^+$ 依存的な carnitine 輸送活性が観察された。さらに、初代培養セルトリ細胞および精巣組織中のセルトリ細胞に OCTN2 が発現していることが明らかになり、*jvs* マウスにおいて精巣への carnitine 移行性が顕著に低下していることより、OCTN2 が血中の carnitine の精巣組織への移行に働いていることが結論付けられた。

### 3. 精巣上体管上皮細胞における OCTN2 を介した carnitine 輸送

精巣上体は、生体内で carnitine が最も高濃度に存在する組織であり、従来からカルニチ

ントランスポーターの存在が示唆されていた。また、OCTN2 が精巣上体管上皮細胞の basolateral 側膜に発現していることが、本研究の進行中に報告された。そこで、精巣上体における carnitine 輸送特性を明らかにし、OCTN2 の特徴と比較した。

初代培養精巣上体管上皮細胞での carnitine 取り込みは、 $\text{Na}^+$  依存的であり、低親和性と高親和性の複数の輸送機構が存在し、その高親和性の輸送機構の carnitine に対する親和性は、OCTN2 のそれと同程度であった。また、精巣上体管上皮細胞での carnitine 取り込みは、OCTN2 と共通の阻害剤により低下した。さらに、jvs マウスにおいて、精巣上体組織への carnitine 移行性が低下することを示した。これらの結果と、jvs マウスでは雄性不妊を伴う精巣上体の機能異常が起こる報告をあわせて考えると、OCTN2 は精巣上体管上皮細胞の basolateral 側膜で血中からの carnitine の精巣上体への移行に必須であると結論付けられた。

#### 4. 精子における OCTN2 および OCTN3 を介した carnitine 輸送

精子の成熟および運動能の獲得には carnitine が必須であり、精子においても OCTN トランスポーター群が機能している可能性が考えられる。そこで精子における carnitine 輸送活性および OCTN トランスポーター群の発現を検討した。

精巣上体より単離した精子における carnitine および acetylcarnitine の輸送は、OCTN2 および OCTN3 様の親和性および阻害剤選択性を示し、両トランスポーターの寄与が示唆された。さらに、OCTN2 と OCTN3 とともに精子に発現し、OCTN2 は精子の尾部主部に、OCTN3 は尾部中間部にそれぞれ発現していた。特に OCTN3 は精子が運動能を獲得する精巣上体尾部で発現が高い傾向が見られ、OCTN2 および OCTN3 が精子の carnitine 取り込みに働き、精子の運動能獲得に働いていることが示唆された。また、本研究が  $\text{Na}^+$  非依存的な OCTN3 様の carnitine 輸送活性が検出された初めての例である。

#### 5. OCTN1 の有機カチオン輸送特性と腎臓における発現

OCTN1 を介した有機カチオン輸送は、腎近位尿細管刷子縁膜において報告のある  $\text{H}^+$ /有機カチオン交換輸送系と類似しており、OCTN1 が  $\text{H}^+$ /有機カチオン交換輸送系の分子の実体なのではないかと考えた。そこで、輸送駆動力として  $\text{H}^+$  および有機カチオンとの交換輸送を考え、腎臓での膜局在性ととともに検討した。

OCTN2 と同様に OCTN1 を発現させた細胞より調製した細胞膜ベシクルを用いた解析ならびに免疫組織化学的解析により、OCTN1 は腎尿細管上皮細胞刷子縁膜に局在し、 $\text{H}^+$  および有機カチオンとの交換輸送活性を有することを示した。また、OCTN1 による有機カチオン輸送は膜電位感受性であり、その点が腎近位尿細管刷子縁膜における  $\text{H}^+$ /有機カチオン交換輸送系と一致しなかった。腎臓においては、尿細管管腔中の pH が酸性であることを考えると、細胞内への内向きプロトン勾配を利用して有機カチオン性化合物の尿細管分泌に働く可能性が示唆された。

## 6. 血球細胞における OCTN1 の発現

OCTN1 は、腎臓以外に胎児肝臓および骨髄に発現が高い。これらの組織は造血組織であるため、OCTN1 が血球系で生理的役割を果たしている可能性を考えた。

骨髄、脾臓および胸腺由来の血球細胞を各血球細胞のマーカー抗体を利用して分画し、各細胞における OCTN1 の発現を検討した。その結果 OCTN1 は、B リンパ球や T リンパ球のようなリンパ系細胞では発現せず、骨髄由来の赤血球系、顆粒球系および造血幹細胞を含む未熟な血球細胞群に発現していた。さらに、末梢成熟赤血球および赤血球マーカー Glycophorin A が発現する前の比較的未熟な赤血球前駆細胞に発現していることが示された。さらに成熟赤血球細胞においてもタンパク質レベルで OCTN1 の発現が見られた。従って、OCTN1 は比較的未熟な時期から末梢赤血球に至る段階で、赤血球系細胞の増殖または分化に必要な物質を取り込んでいるものと考えられた。

## 結論

OCTN トランスポーター群の OCTN1、OCTN2 および OCTN3 は、carnitine 輸送という共通性を有するが、Na<sup>+</sup>依存性のような機能特性や発現部位に各々特異性があり、相互に異なった生理的機能を有することが示された。OCTN1 については生理的機能までは明らかにならなかったが、その駆動力および局在性を示した。本研究遂行中には、関節リウマチおよびクローン病の病因になりうるトランスポーターであることも示唆され、生理的に重要な役割を担っていることは間違いない。生理的基質が明らかになればその役割が解明され、血球細胞での生理的基質の検討により、OCTN1 の生理的機能が明らかになることを期待する。

## 学位論文審査結果の要旨

本研究は有機カチオン / カルニチントランスポーター OCTN family の生理的役割について調べたものである。これまで OCTN2 は全身性カルニチン欠乏症の原因遺伝子であることから、腎においてカルニチンの再吸収に働くことが本学グループにより示唆されていた。しかし遺伝子発現の見られる他の多くの組織における OCTN family の生理的役割は不明であった。本研究は、(i) 腎尿細管での物質輸送における OCTN の役割、(ii) 精子の運動能が脂肪酸代謝に由来することに着目し精子へのカルニチンの供給経路としての OCTN family の役割、(iii) OCTN1 の遺伝子発現が胎児肝や骨髄で高いことに着目し血球系での OCTN1 の役割、について焦点をあて、以下の点が示された。

1) OCTN1 および OCTN2 が腎尿細管刷子縁膜上に発現すること。また、OCTN1 が  $H^+$  / 有機カチオン交換輸送系および有機カチオン / 有機カチオン交換輸送系として機能する一方、OCTN2 は  $Na^+$  / カルニチン共輸送系として機能し、カルニチンの尿細管腔からの再吸収に働いていること。

2) OCTN2 が血液精巣関門を構成するセルトリ細胞の血液側膜におけるカルニチンの取り組みに寄与すること。

3) OCTN2 が精巣上体上皮細胞におけるカルニチン輸送系の分子の実体であり、精子の成熟および運動能の獲得に重要であることが知られるカルニチンの精子形成組織への送達に寄与すること。

4) 精巣上体中精子には OCTN2 と OCTN3 が強く発現し、精子においてこれらトランスポーターによるカルニチン輸送活性が認められること

5) OCTN1 が未分化ならびに分化赤血球に発現すること。

以上の結果は、OCTN family の生理的役割を解明する上での重要な知見と考えられ、腎における有機カチオンやカルニチン輸送による生体のホメオスタシスに維持、生殖機能の維持におけるカルニチンの作用機序の理解、近年報告されている OCTN と疾患との関連性の理解、に大いに貢献するものと認められるため、本論文は博士（薬学）論文に値すると評価された。